

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Auguste-Viktoria-Krankenhauses, Berlin-Schöneberg
Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. Karl Heinz Pfeffer

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
JODIERTER PHENOLISCHER AMINOSÄUREN
IM SERUM

Vergleich der Ergebnisse eines Kollektivs von gesunden
mit den Ergebnissen eines Kollektivs von nierenkranken Patienten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Schmidt
aus Berlin

1969

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Auguste-Viktoria-Krankenhauses, Berlin-Schöneberg

Ärztl. Direktor: Professor Dr.med. Karl Heinz P f e f f e r

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN JODIERTER
PHENOLISCHER AMINOSÄUREN IM SERUM

Vergleich der Ergebnisse eines Kollektivs von gesunden
mit den Ergebnissen eines Kollektivs von nierenkranken
Patienten

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael S c h m i d t

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

Referent: Professor Dr.med. Karl Heinz P f e f f e r

Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Dulce



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 10.7.1969

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	7
Material	9
Methoden	12
Ergebnisse	20
Diskussion	29
Zusammenfassung	34
Literatur	35

E I N L E I T U N G

Bei Erkrankungen der Niere, die von einer Insuffizienz begleitet sind, ist auch eine Einschränkung der renalen Jodid-Clearance möglich (24, 18). Die Bildung, Speicherung und Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen sind - neben vielen anderen Faktoren - auch von der Höhe des Jodid-Spiegels im Serum abhängig. Eine Erhöhung der Konzentration der Jod-Ionen im Serum führt zu einer Hemmung der Peroxydase-Systeme, die die Jodide oxydieren und zu einer Inaktivierung von thyreotropen Hormon (10, 13). Hierdurch kommt es zu einer Störung der Schilddrüsenfunktion.

Andererseits ist es auch bekannt, daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hypothyreosen und bestimmten chronischen Nierenerkrankungen (chronischen Pyelonephritiden) besteht. Pfeffer und Mitarbeiter konnten bei 56% der von ihnen untersuchten Hypothyreosen das Vorliegen einer chronischen Pyelonephritis nachweisen (6).

Aus diesen Gründen erscheint es möglich, daß die Spektren der zirkulierenden Schilddrüsenhormone und ihrer Derivate im Serum als Ausdruck einer Dysfunktion der Schilddrüse bei chronischen Nierenkranken gegenüber Gesunden verändert sind. Diese naheliegende Vermutung ist bis jetzt nicht nachgeprüft worden; das hängt wahrscheinlich mit den technischen Schwierigkeiten beim Nachweis der einzelnen jodierten phenolischen Aminosäuren im Serum zusammen.

Verschiedene Autoren haben sich in der letzten Zeit mit der Verwendung der Dünnschichtchromatographie (DC) zur Trennung der Jod-Phenole beschäftigt (7, 20, 25), wobei in einigen Fällen sogar der chemische Nachweis der zirkulierenden jodierten phenolischen Aminosäuren gelungen ist (8).

Der chemische Nachweis der hier interessierenden Substanzen hat besondere Vorteile gegenüber den meist angewandten isotopischen Techniken:

1. Die Entstehung von Artefakten durch Strahlenschädigung des Schilddrüsenparenchyms wird verhindert (3, 33).
2. Es können Verbindungen nachgewiesen werden, die mit isotopischen Methoden nicht erfaßt werden (35, 32, 42).
3. Die Belastung des Patienten durch die Radio-Jodgabe entfällt.

Die Dünnschichtchromatographie zeichnet sich im Vergleich mit der Papierchromatographie durch hohe Nachweisempfindlichkeit und einen geringen Zeitaufwand aus. Dadurch kann die Menge des zu verarbeitenden Serums klein gehalten werden, und die bei der Durchführung der Papierchromatographie gegebene Möglichkeit der Bildung von Artefakten während des zeitlich langen Verlaufes entfällt (1, 9, 22, 31).

In dieser Arbeit wurden die Spektren der zirkulierenden jodierten phenolischen Aminosäuren von Gesunden und von chronisch Nierenkranken mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht. Die Ergebnisse wurden mit dem Ziel miteinander verglichen, Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen zu finden. Als Vorversuch wurde eine statistische Untersuchung der Schwankungen der R_F -Werte durchgeführt, um die Aussagesicherheit und die Genauigkeit der hier angewandten dünnschichtchromatographischen Methode zu untersuchen.

M A T E R I A L

Es wurden die zirkulierenden jodierten phenolischen Aminosäuren (JPA) bei zwei Kollektiven von Patienten mit Hilfe der später beschriebenen Methoden untersucht. Bei dem ersten Kollektiv (Gesunde) handelte es sich um eine Gruppe von Patienten, die klinisch nierengesund und euthyreot waren und die sich wegen anderer Erkrankungen in klinischer Behandlung befanden. Das zweite Kollektiv (Nierenkranke) setzte sich aus Patienten zusammen, bei denen eine chronische Pyelonephritis diagnostiziert worden war.

Gesunde:

Es wurden die Seren von 25 Patienten untersucht, die anamnestisch und klinisch keine Anzeichen einer Nierenerkrankung aufwiesen. Alle diese Patienten hatten normale Blutdruckwerte (Grenzwert 150/100 mmHg), die Blutsenkungsgeschwindigkeit war im Bereich der Norm, das Harn-Sediment war nicht pathologisch verändert. Bei keinem der Patienten bestanden Insuffizienzzeichen der Niere, wie z.B. Kreatinin-erhöhungen im Serum.

Als Bestätigung der Euthyreose wurde ein Radio-Jod-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse ausnahmslos im Normbereich lagen. Keiner der hier untersuchten Patienten bot Zeichen einer Schilddrüsendysfunktion, auch waren bei allen Patienten die Serumcholesterinwerte normal.

Nierenkranke:

Bei den Patienten dieser Gruppe wurde die Diagnose chronische Pyelonephritis durch die klassischen Kriterien Pyurie, Bakteriurie und Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit, häufig von einer Hämaturie, von einer Blutdruck-erhöhung und/oder von Niereninsuffizienzzeichen begleitet, gestellt (17).

Bei einem Teil der Patienten ist die Diagnose durch ein intravenöses Pyelogramm oder durch Isotopennephrographie weiter erhärtet worden. Zwischen der Durchführung dieser Nierendiagnostik und der Blutentnahme lag immer ein Zeitraum von mehreren Wochen.

Insgesamt wurden die Seren von 24 Patienten untersucht.
(Tab. I)

Pat. Nr.	Alter	Geschl.	Blut- druck	HSG	Serum-Krea- tinin (mg%)	Urinse- diment	Albumi- nurie	Bakter. nachw. im Urin	Intraven. Pyelo- gramm	Isotopennephrogramm tub.Sekret. Exkret. störung
1	53	m	-	+	1,2	+	-	+		(+)
2	62	w	-	+	0,5	+	(+)	-	+	(+)
3	68	w	-	+	0,9	+	+	+		+
4	49	m	+	+	1,4	+	+	-		-
5	71	w	+	+	0,8	+	-	-		+
6	62	w	-	+	2,4	+	-	+		+
7	60	w	+	+	0,9	+	-	+		-
8	70	m	-	+	1,7	+	+	+		+
9	79	w	+	+	2,0	+	+	-		-
10	67	w	-	+	1,0	+	+	-		-
11	67	m	+	+	1,3	+	+	-		-
12	74	w	+	+	1,4	+	+	+		+
13	49	w	-	+	2,3	+	(+)	+	+	(+)
14	81	w	+	+	0,5	+	(+)	+		+
15	74	m	+	+	1,4	+	-	+		+
16	72	w	+	+	1,3	+	+	-		+
17	57	w	-	+	0,9	+	+	+		+
18	64	w	+	+	1,8	+	+	+		+
19	75	w	(+)	+	1,4	+	-	+		+
20	75	w	+	+	0,7	+	-	-		+
21	77	w	+	+	3,3	+	(+)	+	+	+
22	51	m	+	+	1,6	+	+	-	+	+
23	66	w	-	+	2,0	+	(+)	-		-
24	61	w	-	+	0,8	+	-	+	+	+

ERKLÄRUNG:

+ = deutliche Störung

(+) = angedeutete Störung

- = keine Störung

Blutdruck: Grenzwert 150/100 mmHg

M E T H O D E N

Extraktionsverfahren:

Für die Extraktion der Schilddrüsenhormone und ihrer Derivate aus dem Serum der untersuchten Patienten wurde ein Verfahren mit heißem Methanol benutzt (43). Die damit gewonnenen Jod-Phenole sind von Substanzen, die die dünnenschichtchromatographische Trennung stören können, weitgehend gereinigt; der erhaltene Endextrakt wird eingengt und direkt auf die DC-Platte aufgetragen. Die Ausbeute dieser Methode ist hoch, dadurch kann die Ausgangsmenge der zu untersuchenden Seren klein gehalten werden.

Die Extraktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

5 ml Seren werden in einem Zentrifugenröhrchen mit Schliff von etwa 65 ml Fassungsvermögen mit einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure auf $\text{pH} < 5$ eingestellt, mit 0,5 ml 1M Propylthiouracillösung versetzt, und nach Zugabe von 15 ml Methanol 5 Min. am Rückflußkühler im Wasserbad gekocht. Durch Zentrifugieren (3 Min. bei 2000 U/Min.) werden der Eiweißrückstand und die wässrig-alkoholische Phase getrennt, letztere wird in ein anderes Schliffröhrchen überführt. Der Eiweißrückstand wird mit 5 ml Diäthyläther 5 Min. geschüttelt und anschließend 3 Min. zentrifugiert. Die ätherische Phase wird mit der alkoholischen vereinigt. In der gleichen Weise wird eine nochmalige ätherische Reextraktion des Eiweißrückstandes angeschlossen.

Die alkoholätherische Phase wird nun mit 2 g einer Mischung Natriumsulfat-Aktivkohle 200:1 3 Min. geschüttelt, 3 Min. zentrifugiert und, nach Abtrennung des Rückstandes, in ein anderes 65 ml Schliffröhrchen überführt und am Rotationsverdampfer bei Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) und nicht über 60° eingengt. Der Rückstand wird

mit 3 ml 0,05N Natronlauge aufgenommen und in ein 45 ml Zentrifugenröhrchen mit Schliff gebracht. Das vorherige Röhrchen wird mit 3 ml 0,05N Natronlauge nachgespült, dieser Anteil wird mit dem anderen gemischt.

Zu der wässrigen Lösung werden, nach Kontrolle des $\text{pH} > 10$ mit Indikatorpapier, 7 ml Petroläther gegeben, dann wird 3 Min. geschüttelt und 3 Min. zentrifugiert. Der Petroläther wird abgesaugt.

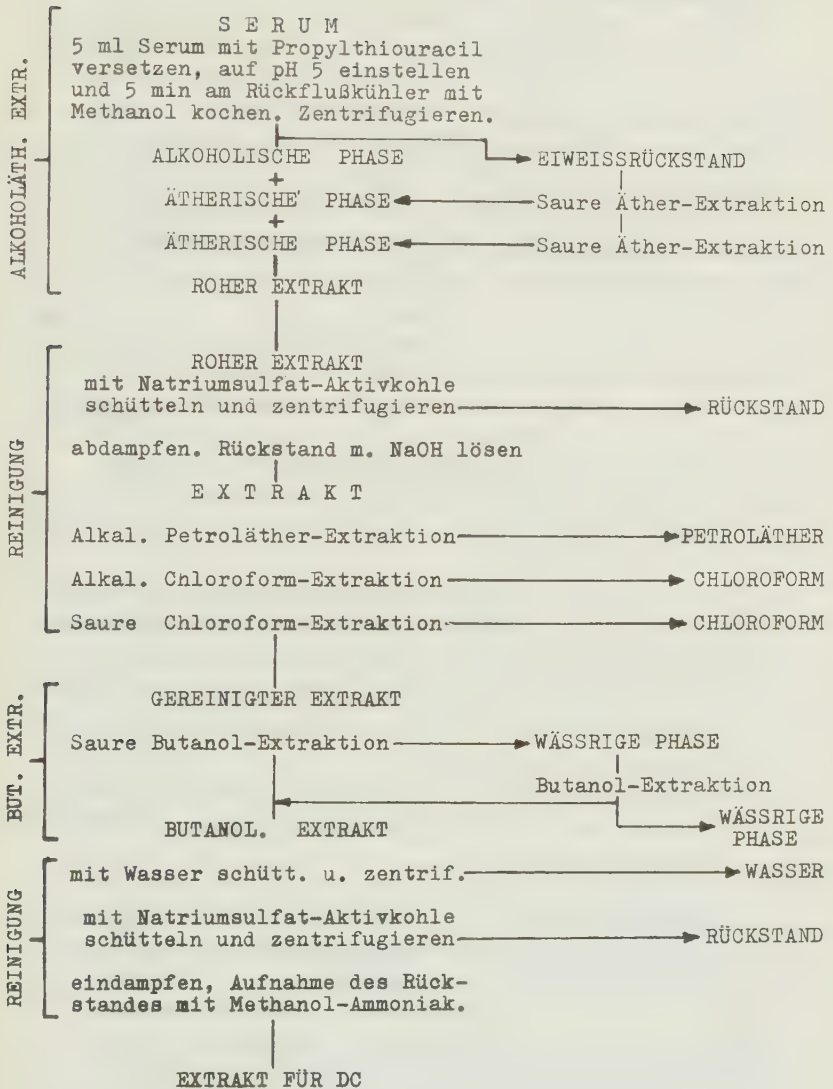
Danach werden in der gleichen Weise eine Extraktion der wässrigen Phase mit 4 ml Chloroform (im alkalischen Bereich) und, nach Einstellung des $\text{pH} < 5$ mit einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure, eine nochmalige Extraktion mit 3 ml Chloroform (im sauren Bereich) durchgeführt. Die nicht abgesaugten Reste des Chloroforms werden bei Unterdruck abgedampft.

Die wässrige Lösung wird jetzt mit 5 ml redestilliertem n-Butanol 10 Min. geschüttelt, dann 3 Min. zentrifugiert. Die butanolische Phase wird abgesaugt und in ein anderes 45 ml Zentrifugenröhrchen gebracht. Die wässrige Lösung wird noch einmal mit 4 ml redestilliertem n-Butanol 3 Min. geschüttelt und dann zentrifugiert. Diese butanolische Phase wird mit der vorherigen vereinigt.

Die butanolische Phase wird mit 5 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Nach Zentrifugieren wird das Wasser abgesaugt. Anschließend wird die butanolische Phase mit 2 g der Mischung Natriumsulfat-Aktivkohle 200:1 3 Min. geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wird in einem 65 ml Zentrifugenröhrchen mit Schliff bei 60° und Unterdruck eingedampft.

Der Rückstand wird mit 0,15 ml einer Mischung Methanol-6 N Ammoniak 9:1 aufgenommen und auf die DC-Platte aufgetragen.

Eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsgänge gibt das Schema.



Dünnschichtchromatographie:

Es wurden Glasplatten von 20 x 20 cm Größe benutzt, die mit Hilfe eines Desaga-Streichgerätes (Einstellung 0,5 mm) beschichtet wurden. Als Sorptionsmittel diente Cellulose mit Gipszusatz (MN 300 G der Fa. Machery, Nagel & Co.), auf jeweils 5 Platten wurden eine breiige Suspension von 25 g MN 300 G und 150 ml Wasser aufgetragen. Nach Trocknung sind die Platten im Exsikkator über Blau-Gel aufbewahrt worden (26).

Auf die DC-Platten wurden, neben dem Extrakt 10 µl, einer leicht alkalischen Mischung von Standardsubstanzen, bestehend aus 3, 3', 5, 5'-Tetraiod-Dl-Thyronin (T_4), 3, 3', 5-Triiod-Dl-Thyronin (T_3), 3, 5-Dijod-Dl-Thyronin (T_2), 3, 5-Dijod-L-Tyrosin (DIT) und 3-Monoiod-L-Tyrosin (MIT) in einer Konzentration von jeweils 0,05 mg/ml, aufgetragen.

Die DC-Platten wurden einer zweidimensionalen, aufsteigenden Chromatographie in mit Filterpapier ausgekleideten Glaskammern unterworfen. Eine Raumsättigung des Fließmittels wurde durch Schütteln erreicht. Im Verlauf des 1. Verfahrens wurden die im Auftragsfleck verbliebenen Lipide entfernt. Hierzu diente als 1. Fließmittel eine Mischung von Chloroform und Petroläther im Verhältnis 1:1. Die jodierten phenolischen Aminosäuren wandern darin praktisch nicht.

Nach Beendigung des 1. Verfahrens wurde das Fließmittel abgedampft und dann die eigentliche Trennung der jodierten phenolischen Aminosäuren in der 2. Richtung durchgeführt. Die Standardsubstanzen und der Extrakt wanderten hierbei parallel. Als 2. Fließmittel diente eine Mischung von Aceton-0,5 N Essigsäure im Verhältnis 2:8. In diesem System gelingt eine Trennung der JPA (41), die mit folgenden R_F -Werten wandern:

MIT = 0,82; DIT = 0,70; T_2 = 0,59; T_3 = 0,29; T_4 = 0,14.

Anschließend wurden die Platten im Brutschrank über Nacht getrocknet und dann mit dem Anfärbereagenz besprüht.

Bei der Voruntersuchung sind 5 mal je 5 μ l der oben angegebenen Mischung von Standardsubstanzen nebeneinander auf eine DC-Platte aufgetragen worden. Anschließend wurde eine eindimensionale, aufsteigende Chromatographie in mit Filterpapier ausgekleideten Glaskammern mit Aceton-0,5N Essigsäure 2:8 als Fließmittel ausgeführt. Insgesamt sind 10 x 5 Chromatogramme unter den beschriebenen Bedingungen angefertigt worden.

Farbreagenz:

Als chemische Nachweismethode für die jodierten phenolischen Aminosäuren wurde die Ferrichlorid-Ferricyanid-Arsenige Säure-Reaktion von Gmelin und Virtanen (5), in einer Modifikation für die Dünnschichtchromatographie benutzt (39). Hierbei werden Ferricyanid- und Ferrichlorid-Ionen durch arsenige Säure in Anwesenheit von katalytischen Jodidmengen reduziert. Dabei entsteht ein blaues Pigment, angeblich eine Mischung von Preußisch- und Turnbolls-Blau, das in der Schicht fixiert wird.

Die Lösungen A, B und C werden unmittelbar vor dem Aufsprühen auf die DC-Platte im Verhältnis 5:5:1 gemischt.

Lösung A: 2,7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml 2N HCl.

Lösung B: 3,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 ml Aqua Bidest.

Lösung C: 5 g AsO_2Na in 30 ml N NaOH und mit 65 ml 2 N HCl unter Rühren bei 0° versetzt.

Nach dem Besprühen der Platten mit dem FFCA-Reagenz wurde eine zusätzliche Besprühung mit 2% Natriumcarbonat-Lösung vorgenommen, hierdurch wird eine zunehmende Aus-

dehnung der dargestellten Flecke und eine Anfärbung des Hintergrundes zeitweise verhindert.

Anschließend wurden die DC-Platten sofort photographiert.

Auswertung der Chromatogramme:

Zur Dokumentation wurden Schwarz-weiß-Abzüge der Chromatogramme hergestellt. Außerdem wurden Abzüge der Chromatogramme in Originalgröße auf transparentem Film gemacht. In einem Elphor-Integraph (Dr. Bender und Dr. Hobein, München-Karlsruhe-Zürich) wurden die im Streifen zerschnittenen transparenten Filme ausgewertet und aus den erhaltenen Extinktionskurven die R_F -Werte der dargestellten Flecke berechnet.

$$R_F = \frac{\text{Wanderungsstrecke der unbekannten Substanz}}{\text{Wanderungsstrecke des Fließmittels}}$$

Die Laufstrecke der einzelnen Flecken kann mit Hilfe der Extinktionskurven objektiv ausgemessen werden. Dies ist direkt am entwickelten Chromatogramm oder an einem Papierabzug schwierig durchzuführen, da die dargestellten Flecken eine unterschiedliche Größe haben, oft oval begrenzt sind und dem Auge homogen gefärbt erscheinen. (Abbildung I)

Eine quantitative Aussage kann dagegen aus den Extinktionskurven der einzelnen Chromatogramme nicht gemacht werden. Bei dem Besprühen der DC-Platten wird nur die Oberfläche der Flecken erfaßt, die Intensität der Anfärbung geht nicht dem Jodgehalt der JPA parallel (40). Aus technischen Gründen mußten bei der Auswertung verschiedene Blenden verwertet werden, da die Abzüge auf transparentem Film von unterschiedlicher Qualität waren, und der Schwärzungsgrad in weitem Bereich schwankte.

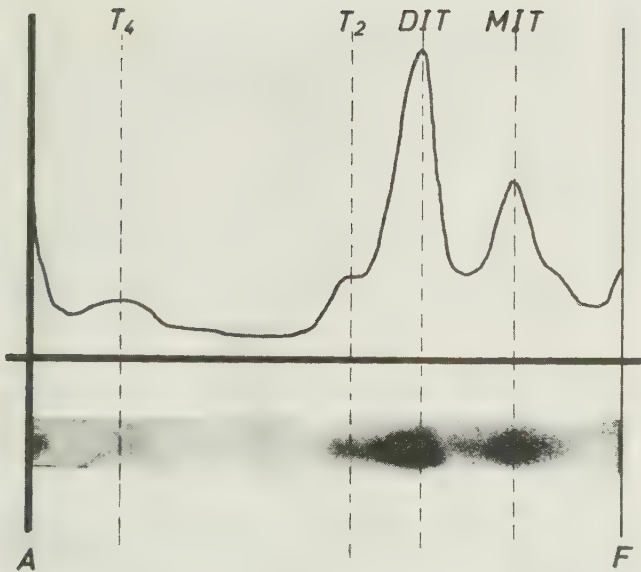


Abb. I: CHROMATOGRAMM AUS DEM KOLLEKTIV DER GESUNDEN
MIT DAZU GEHÖRENDER EXTINKTIONSKURVE.
Näheres siehe Text.

Statistische Bewertung:

Bei den Chromatogrammen der Voruntersuchungen wurde eine Berechnung der Durchschnittswerte der R_F -Werte und ihrer Standardabweichungen vorgenommen.

Die Standardabweichungen (S.A.) wurden jeweils nach der Formel berechnet:

$$\text{S.A.} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_1)^2 + \dots (\bar{x} - x_n)^2}{n - 1}}$$

$x_1, x_2, \dots x_n = R_{\underline{F}}$ -Werte

$\bar{x} =$ arithmetisches Mittel der $R_{\underline{F}}$ -Werte

$n =$ Anzahl der $R_{\underline{F}}$ -Werte

E R G E B N I S S E

Vorversuch:

In dem hier verwendeten chromatographischen System ist eine Trennung der Mischung aus T_4 , T_3 , T_2 , DIT und MIT einwandfrei möglich. Nach der Anfärbung mit dem FFCA-Reagenz zeigen sich gut abgegrenzte, rundlich-ovale, homogen gefärbte Flecken, die den einzelnen JPA entsprechen. Die R_F -Werte der dargestellten Flecken sind deutlich voneinander verschieden. Bei der Auswertung aller 50 angefertigten Chromatogramme zeigen die den einzelnen Flecken zugehörigen R_F -Werte jeweils eine große Konstanz. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die JPA zu identifizieren.

In Tabelle II sind die arithmetischen Mittelwerte der R_F der dargestellten JPA, aus 50 Chromatogrammen berechnet und ihre Standardabweichungen eingetragen.

Substanz	R_F -Mittelwert	Standardabweichung	Fließmittelfront
MIT	0,82	0,05	
DIT	0,70	0,05	
T_2	0,59	0,04	
T_3	0,29	0,04	
T_4	0,15	0,03	
			Auftragslinie

Tab. II: DURCHSCHNITTSWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN DER R_F VERSCHIEDENER JPA IN DEM ANGEgebenEN CHROMATOGRAPHISCHEN SYSTEM. Die Substanzen sind nach der Größe ihrer R_F -maßstabsgerecht von unten nach oben eingetragen.

Zahl der Chromatogramme = 50.

Die kürzeste Laufstrecke in dem benutzten chromatographischen System hat T_4 , dann folgen T_3 , T_2 , DIT und schließlich MIT. Die Standardabweichungen liegen in der Größenordnung von Hundertsteln der R_F -Werte, bei kleinem R_F -Wert sind sie am geringsten und vergrößern sich etwas bei den JPA, die eine längere Laufstrecke haben.

VERSUCHE:

1. Kollektiv der Gesunden

Bei allen in diesem Kollektiv untersuchten Seren ist die chromatographische Trennung des Extraktes gelungen. Nach der Entwicklung der Chromatogramme werden mehrere scharf begrenzte, deutlich voneinander abgesetzte Flecken sichtbar, die längs- oder queroval geformt sind. Manchmal tritt bei einzelnen Flecken eine Schwanzbildung auf. Die Flecken sind in sich gleichmäßig gefärbt, die Intensität der Anfärbung ist bei verschiedenen Flecken unterschiedlich.

Die Anzahl der dargestellten Flecken auf jedem Chromatogramm ist verschieden. Meist sind drei oder vier Flecke sichtbar, selten noch mehr oder nur zwei Flecke.

In 65% der hier untersuchten Fälle finden sich Flecken, die weiter als MIT laufen. Zusätzliche Untersuchungen haben ergeben, daß es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um nicht jodierte Tyrosine und Thyronine handelt. Im Folgenden werden diese Substanzen nicht mehr angeführt, da ihre Identität noch nicht ausreichend aufgeklärt ist. Diese Flecken sind mit der gleichen Häufigkeit bei dem Kollektiv der Nierenkranken nachweisbar.

In Tabelle III sind die einzelnen Flecken nach ihren R_F -Werten eingetragen, gleichzeitig ist die absolute und prozentuale Häufigkeit ihres Auftretens vermerkt.

Die in der Tabelle III als T_4 , T_2 , DIT und MIT bezeichneten Flecken stimmen in ihren R_F -Werten mit denen der entsprechenden, auf jedem Chromatogramm gleichzeitig mitgelaufenen, Standardsubstanzen überein.

Diejenigen Flecken, die sich nicht als bestimmte JPA identifizieren lassen, wurden als U_1 , U_2 und U_3 bezeichnet. Sie haben folgende R_F -Werte:
 $U_1 = 0,35$, $U_2 = 0,63$, $U_3 = 0,76$.

Die Abbildung II zeigt Chromatogramme aus dem Kollektiv der Gesunden.

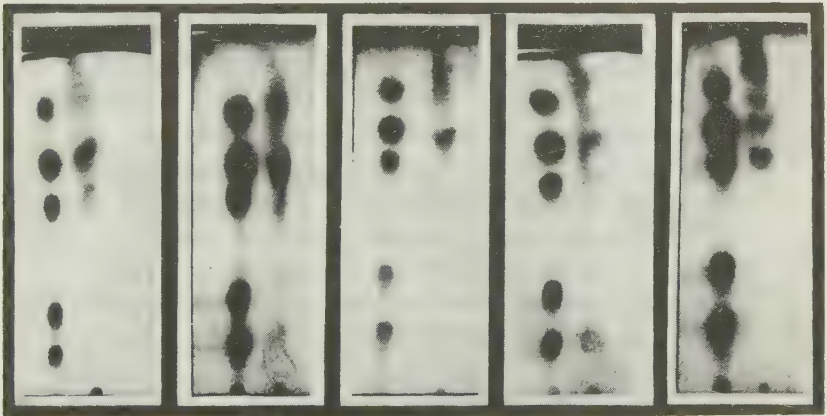


Abb. II: PAPIERABZÜGE VON CHROMATOGRAMMEN AUS DEM KOLLEKTIV DER GESUNDEN. Auf jedem Chromatogramm sind links die Mischung von Standardsubstanzen und rechts die zu identifizierenden JPA aufgetragen.

Sub- stanz	Zahl der Flecken		Fließmittel- front
	absolut	in Prozenten	
MIT	18	72	
U ₃	5	20	
DIT	23	92	
U ₂	4	16	
T ₂	16	64	
U ₁	4	16	
T ₃	0	0	
T ₄	12	48	
			Auftrags- linie

Tab. III: ABSOLUTE UND PROZENTUALE BERECHNUNG DER HÄUFIGKEIT DES AUFTRETENS EINZELNER FLECKEN IN DEN CHROMATOGRAMMEN DER NORMALEN.

Die Flecken sind nach der Größe ihrer R_F -Werte maßstabsgerecht von unten nach oben eingetragen. Die als Thyronine und Tyrosine angesprochenen Substanzen sind nicht berücksichtigt. Weiteres im Text.

Zahl der Chromatogramme = 25.

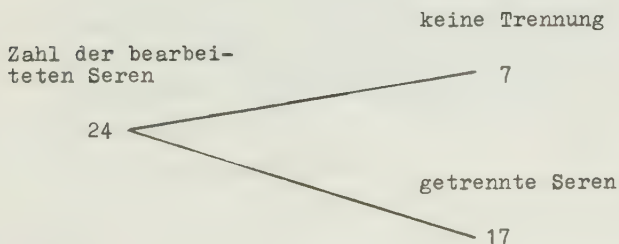
2. Kollektiv der Nierenkranken

Nach den Ergebnissen der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung können die Seren dieses Kollektivs in zwei Gruppen eingeteilt werden:

In 71% der hier untersuchten Seren ist eine chromatographische Trennung des Extraktes gelungen. Auf den Chromatogrammen zeigen sich jeweils mehrere scharf begrenzte Flecken, deren R_F -Werte bestimmt werden können. Diese Flecke sind nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit und der Häufigkeit ihres Auftretens in die Tabelle IV eingetragen. Ihre Bezeichnung erfolgte, analog der Tabelle III, nach der Übereinstimmung der R_F -Werte mit denen der entsprechenden Standardsubstanzen.

Die R_F -Werte der nicht identifizierbaren Substanzen sind: $U_1' = 0,55$, $U_2 = 0,64$ und $U_3 = 0,76$.

Bei der zweiten Gruppe (29% der Seren) ist eine Auftrennung des Extraktes in einzelne Flecken nicht gelungen. Zur Darstellung kommt nach der Entwicklung der Chromatogramme lediglich eine Schwanzbildung, die über den Bereich der Thyronine und Tyrosine geht.



Die Abbildung III zeigt Chromatogramme aus dem Kollektiv der Nierenkranken.

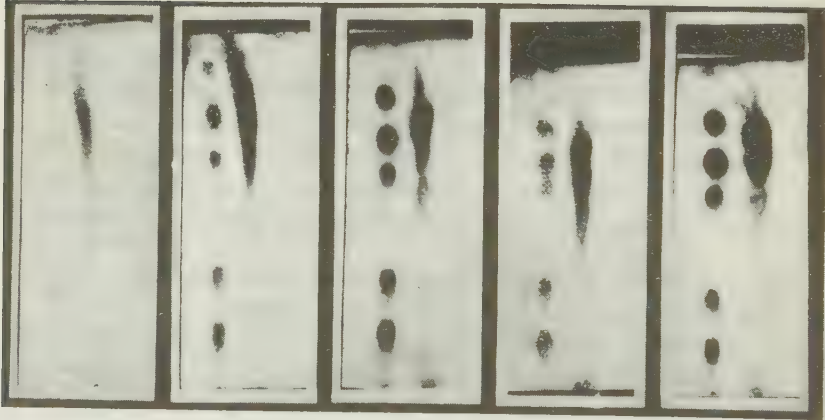


Abb. III: PAPIERABZUGE VON CHROMATOGRAMMEN AUS DEM KOLLEKTIV DER NIERENKRANKEN.

Auf jedem Chromatogramm sind links die Mischung von Standardsubstanzen und rechts die zu identifizierenden JPA aufgetragen. Bei den Chromatogrammen Nr. 1, 2 und 4 ist eine Trennung nicht gelungen, und es zeigt sich eine Schwanzbildung.

Sub- stanz	Zahl der Flecken		Fließmittel- front
	absolut	in Prozenten	
MIT	8	47	
U ₃	9	53	
DIT	16	94	
U ₂	7	41	
T ₂	9	53	
U ₁	2	12	
T ₃	1	6	
T ₄	1	6	
			Auftrags- linie

Tab. IV: ABSOLUTE UND PROZENTUALE BERECHNUNG DER HÄUFIG-
KEIT DES AUFTRETENS EINZELNER FLECKEN IN DEN
CHROMATOGRAMMEN DER NIERENKRANKEN, BEI DENEN
EINE TRENNUNG GELANG.

Die Flecken sind nach der Größe ihrer R_F -Werte
maßstabsgerecht von unten nach oben eingetragen.
Die als nichtjodierte Phenole angesprochenen
Substanzen sind nicht berücksichtigt.
Weiteres im Text.

Zahl der Chromatogramme = 17.

3. Vergleich der Ergebnisse

Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Seren von Nierenkranken sind gegenüber denen bei Gesunden deutlich verschieden:

a.) In 29% der untersuchten Fälle ist eine chromatographische Auftrennung des Extraktes bei dem Kollektiv der Nierenkranken nicht möglich gewesen. Es tritt hier nur eine Schwanzbildung über den gesamten Bereich der Thyronine und Tyrosine auf.

b.) Die Häufigkeit des Auftretens einzelner Substanzen ist bei den beiden Kollektiven sehr unterschiedlich. Besonders bemerkenswert ist es, daß T_4 bei den Nierenkranken in nur 6% gegenüber 48% bei den Gesunden nachgewiesen werden konnte.

Auch andere Substanzen, insbesondere die unbekannten Zwischensubstanzen U_2 und U_3 treten in den beiden Kollektiven verschieden häufig auf.

Die Abbildung IV soll diese Verhältnisse verdeutlichen.

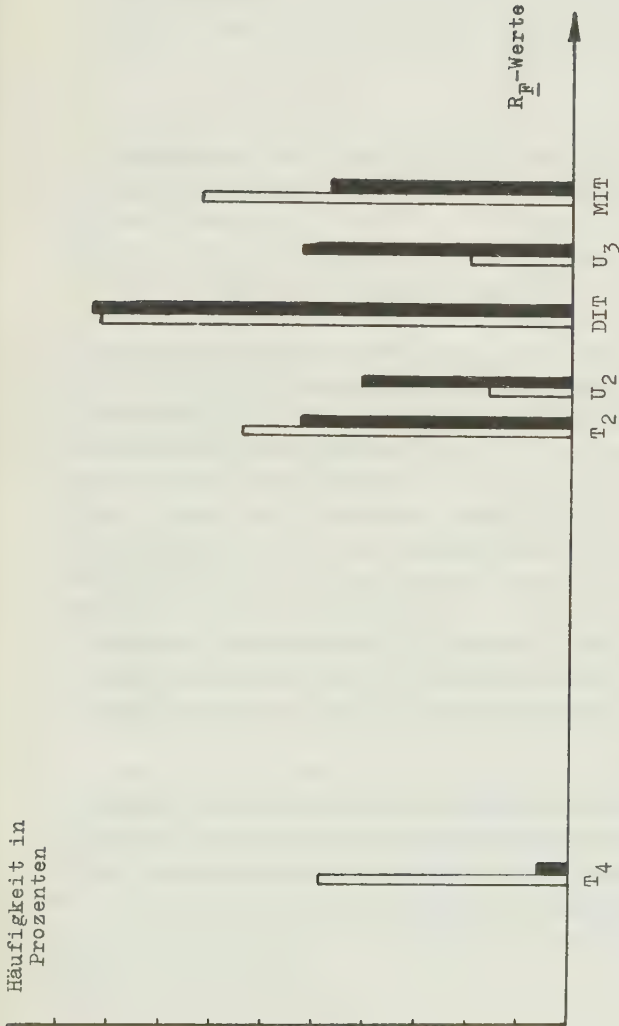


Abb. IV: VERGLEICH DER HÄUFIGKEIT DES AUFTRETENS EINZELNER FLECKEN IN DEN CHROMATOGRAMMEN DER GESUNDEN UND DER NIERENKRANKEN. Die Flecken sind nach der Größe ihrer R_F-Werte maßstabsgerecht von links nach rechts eingetragen.

Weiße Säulen = Ergebnisse bei dem Kollektiv der Gesunden

Schwarze Säulen = Ergebnisse bei dem Kollektiv der Nierenkranken

DISKUSSION

Die auf den DC-Platten dargestellten Flecken wurden durch ihr chromatographisches Verhalten identifiziert. Bei den Vorversuchen ist die Aussagegenauigkeit dieses Vorgehens überprüft worden, es ergab sich eine hohe Konstanz der R_F -Werte der einzelnen JPA in dem verwendeten chromatographischen System.

Die Anwendung von chemischen Methoden zur Darstellung der Flecken bedingt keine Spezifität des Nachweises der JPA. Dies gilt für das hier gebrauchte FFCA-Reagenz und auch für die von Bowden in die Chromatographie eingeführte klassische Reaktion mit Cer IV-Sulfat nach Kolthoff und Sandell (2, 4, 19).

Die Verwendung von chemischen Nachweismethoden bei den hier durchgeführten Untersuchungen erfolgte trotz dieser Eigenschaften wegen der von Werner und Block festgestellten und von verschiedenen Autoren bestätigten Tatsache, daß mit isotopischen Methoden die Darstellung der zirkulierenden jodierten Verbindungen unvollständig ist. Darüberhinaus ist bei möglichen hypothyreoten Zuständen anzunehmen, daß die Markierungsrate der JPA noch geringer ist. Außerdem entfallen bei der Nichtanwendung von radioaktivem Material die Strahlenbelastung des Patienten sowie die Möglichkeit der Bildung von Strahlungsartefakten innerhalb des Schilddrüsensparenchyms.

Das Auftreten von Artefakten im Verlaufe der Extraktion und des chromatographischen Verlaufes bei der hier angewandten Technik konnte durch methodische Kontrollen ausgeschlossen werden (44).

Bei der Untersuchung des Kollektivs der Gesunden wurde kein einheitliches Spektrum der zirkulierenden JPA gefunden, die Häufigkeit des Auftretens einzelner Verbindungen wurde deshalb in Prozenten, bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Fälle, ausgedrückt. So kann festgestellt werden, daß in 48% der Fälle Flecken von Thyroxin chemisch nachweisbar waren und daß mit derselben chemischen Methode T_2 in 64%, DIT in 92% und MIT in 72% der Fälle sich nachweisen lassen.

Außerdem kommen einige Flecke zur Darstellung, deren R_F -Werte nicht mit denen der Standardsubstanzen übereinstimmen, und die daher aus ihrem chromatographischen Verhalten nicht zu identifizieren sind. Aus den oben erwähnten Gründen muß es auch offen bleiben, ob es sich hierbei um jodierte Verbindungen handelt.

Bei der verwendeten Untersuchungsmethodik ist die Nachweishäufigkeit von Thyroxin geringer als sonst von anderen Autoren angegeben worden ist. Diese fanden bei isotopischen Untersuchungen Thyroxin in 70 - 100% der Fälle (11). Es muß in diesem Zusammenhang auf die verhältnismäßig kleine Ausgangsmenge von Serum und auf die niedrige Empfindlichkeit der chemischen Nachweismethode hingewiesen werden. Jedenfalls wird die Anwesenheit von Thyroxin in Zusammenhang mit den klinischen Untersuchungen und den Ergebnissen der Laboruntersuchungen des Kollektivs als Ausdruck der Euthyreose gewertet.

Die verhältnismäßig häufige Anwesenheit von T_2 ist auffällig. Diese Substanz wird meist als Dejodierungsprodukt des Thyroxins und des Trijodthyronins gewertet (10). T_2 wird sehr schnell metabolisiert und verschwindet rasch aus der Peripherie (27, 28, 29), deshalb war es eigentlich zu erwarten, daß diese Substanz nicht zur Darstellung kommt.

Der regelmäßige Nachweis von Jod-Tyrosinen bei dem Kollektiv der euthyreoten Patienten steht in Einklang mit den Ergebnissen einer Reihe von Untersuchungen (34, 23, 36). Ihre Herkunft ist nicht eindeutig geklärt: von einigen Autoren werden sie als Abbauprodukte der Jod-Thyronine aufgefaßt (37), von anderen wird auch eine Inkretion der Tyrosine durch die Schilddrüse für möglich gehalten (12).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Untersuchung des Kollektivs der Nierenkranken ist in erster Linie auffällig, daß bei 29% keine Trennung der FFCA-positiven Substanzen erreicht wurde.

Technische Unzulänglichkeiten als Ursache dieser Erscheinung scheiden aus, da eine Trennung bei den übrigen untersuchten Seren und bei den Vorversuchen in jedem Fall gelang, und da bei den Chromatogrammen, bei denen sich diese Schwanzbildung zeigte, die gleichzeitig mitgelaufene Mischung von Standardsubstanzen einwandfrei getrennt war.

Der Grund dieses Phänomens ist eher in der Anwesenheit von atypischen jodierten Substanzen zu suchen, die von einigen Autoren als butanolunlösliche Fraktion bezeichnet wurden (14, 16, 15). Zu diesen gehört unter anderen Thyreoglobulin, von dem sich die fest gebundenen Schilddrüsenhormone durch gewöhnliche Extraktionsverfahren nicht trennen. Bei den hier untersuchten klinischen Fällen ist dies aber unwahrscheinlich, da Thyreoglobulin vorwiegend nach Schilddrüsenchirurgie oder nach Bestrahlung im Blut nachgewiesen wurde (38). Andere, chemisch nicht identifizierte, halogenierte Fraktionen treten bei verschiedenen pathologischen Zuständen der Schilddrüse, besonders solchen, die mit einer Hormonsynthesestörung einhergehen, auf (21, 30). Sie können die chromatographische Trennung der zirkulierenden JPA behindern.

Bei der anderen Gruppe des Kollektivs der Nierenkranken, bei der die chromatographische Auftrennung des Extraktes gelang, ist die Verteilung der Flecke anders als bei dem Kollektiv der Normalen. Die auffälligsten Änderungen sind die starke Abnahme des Nachweises von Thyroxin und das vermehrte Auftreten von nicht identifizierbaren Zwischensubstanzen. DIT und MIT sind bei den pathologischen Fällen in ihrer Nachweishäufigkeit praktisch nicht verändert. Dies deutet auf die physiologische Bedeutungslosigkeit der Jod-Tyrosine, denen auch in der Literatur keinerlei hormonelle oder stoffwechselaktive Wirkungen zugeschrieben werden (10). Ein weiterer Hinweis hierauf ist die geringe Markierungsrate dieser Substanzen mit Radio-Jod (42).

Die Abnahme der Nachweishäufigkeit des Thyroxins dagegen kann als Ausdruck einer Dysfunktion der Schilddrüse im Sinne einer Hypothyreose gewertet werden. Hier ist erwähnenswert, daß mit der hier verwendeten Methodik von einigen Autoren eine auffällige Zunahme des Nachweises von T_4 bei Hyperthyreosen gefunden wurde (39).

Die nicht identifizierbaren Substanzen können an Hand ihres chromatographischen Verhaltens in zwei Gruppen unterteilt werden:

Die erste Gruppe läuft weiter als MIT und tritt auf den Chromatogrammen des Kollektivs der Gesunden und auf denen des Kollektivs der Nierenkranken in gleicher Häufigkeit (65%) auf. Es handelt sich, wie oben schon erwähnt, vermutlich um nicht jodierte Thyronine und Tyrosine (45).

Die zweite Gruppe läßt sich nach ihrem chromatographischen Verhalten zwischen T_2 und DIT und zwischen DIT und MIT einordnen. Die Häufigkeit ihres Auftretens bei dem Kollektiv der Nierenkranken ist deutlich vermehrt.

Die Ursache hierfür ist ebenso ungeklärt wie die chemische Natur der Substanzen, die sich mit der hier verwendeten Methode, wie oben schon ausgeführt, nicht aufklären läßt. Da ihr vermehrtes Auftreten aber kennzeichnend für die Chromatogramme der Nierenkranken ist, kann diesen Substanzen eine Bedeutung bei den untersuchten pathologischen Zuständen nicht abgesprochen werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und chemischen Nachweismethoden die Spektren der zirkulierenden Schilddrüsenhormone und ihrer Derivate bei einem Kollektiv von Euthyreoten und einem anderen von chronisch nierenkranken Patienten untersucht.

Bei dem Kollektiv der Euthyreoten war Thyroxin in der Hälfte der Fälle nachweisbar, T_2 in einem etwas höheren Prozentsatz, Jod-Tyrosine bei fast allen Patienten.

Bei dem Kollektiv der Nierenkranken waren zwei Gruppen von Chromatogrammen erkennbar:

Eine Gruppe, bei der keine Trennung der anwesenden Substanzen erreicht wurde und eine andere, bei welcher die Trennung gelang. Bei dieser letzten Gruppe sind die auffälligsten Tatsachen das Absinken der Nachweisrate von Thyroxin und die Häufigkeit des Auftretens nicht-identifizierbarer Substanzen, während die Jod-Tyrosine praktisch in der gleichen Häufigkeit wie bei dem Kollektiv der Euthyreoten auftraten.

Diese Tatsachen geben den Spektren der zirkulierenden JPA bei chronisch Nierenkranken ein charakteristisches Aussehen, das sich deutlich von dem der normalen Patienten unterscheidet.

L I T E R A T U R

- 1) Acland, D.J.

A possible source of artifacts in the chromatography of tissue extracts containing inorganic iodide.
Nature (London), 170, 32 (1952)

- 2) Barker, S.B.

Further studies on the ceric sulfate-arsenious acid reaction for the detection of various analogues of thyroxine.
Biochem.J., 90, 214 (1964)

- 3) Benua, R.S., Dobyns, B.M.

Iodinated compounds in the serum, disappearance of radioactive iodine from the thyroid, and clinical response in patients treated with radioactive iodine.
J.Clin.Endocr., 15, 118 (1955)

- 4) Bowden, C.H., Mac Lagan, N.F., Wilkinson, J.H.

The application of the ceric sulfate-arsenious acid reaction to the detection of thyroxine and related substances.
Biochem. J., 59, 93 (1955)

- 5) Gmelin, R., Virtanen, A.S.

A sensitive colour reaction for the paper chromatographic detection of iodide, iodinated tyrosines and thyronines.
Acta chem.scand., 13, 1468 (1959)

- 6) Gries, G., Pfeffer, K.H.

Untersuchungen zur Entstehung von chronischen Pyelonephritiden bei Hypothyreosen.
Med.Welt, 17 (N.F.), 936 (1966)

Hollingsworth, D.R., Dillard, M., Bondy, P.K.
Seperation of iodoamino acids and related compounds
by thyn-layer chromatography.
J.Lab.& Clin.Med., 62, 346 (1963)

8) Hoppe, G., Zappi, E., Gries, G.
Ein neues kombiniertes Verfahren zur Analyse von
Schilddrüsen-Hormonen und deren Metaboliten im Serum.
Nucl.-Med. VI, 1, 44 (1967)

9) Kennedy, T.H.
Identification of two artifacts in an alkaline
hydrolysate of thyroid tissue.
Nature (London), 179, 50 (1957)

10) Klein, E.
Physiologie der Schilddrüse und ihrer Hormone.
In: Die Krankheiten der Schilddrüse,
Oberdisse, K., Klein, E., S. 50 - 180.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)

11) Klein, E.
Der normale und pathologische Umsatz von
Schilddrüsenhormonen in der Körperperipherie.
Klin.Wschr., 40, 3 (1962)

12) Klein, E.
Der endogene Jodhaushalt des Menschen und
seine Störungen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)

13) Labhart, A.
Die Schilddrüse
In: Klinik der inneren Sekretion
Hrsgb. Alexis Labhart, S. 147 - 256.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957)

- 14) Lamberg, B.A., Hintze, G.
Das Syndrom des Butanol-unlöslichen Jodproteins im
Serum erwachsener eumetabolischer Kropfpatienten.
Dtsch.med.Wschr., 88, 434 (1963)

- 15) Man, E.B., Bondy, P.K.
Clinical significance of serum butanol-extractable
iodine.
J.Clin.Endocr., 17, 1373 (1957)

- 16) Man, E.B., Kydd, D.M., Petrus, J.P.
Butanol extractable iodine of serum.
J.Clin.Invest., 30, 531 (1951)

- 17) Niederhäusern, W.v., Wildbolz, E.
Klinik der akuten und der chronischen Pyelonephritis.
In: Handbuch der Urologie
Hrsgb. C.E. Alken, V.W. Dix, H.M. Weyrauch und
E. Wildbolz
Band IX/1, S. 86 - 122.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964)

- 18) Perry, W.F., Hughes, J.F.S.
The urinary excretion and thyroid uptake of iodine
in renal disease.
J.Clin.Invest., 31, 457 (1952)

- 19) Postmes, T.
Differentiation between iodine and non iodine spots
on paper chromatograms during the microquantitative
determination of iodinated aminoacids of human serum.
Clin.Chem.Acta, 10, 581 (1964)

- 20) Quellette, R.P., Balcius, J.F.
A thin-layer system for the separation of iodine-containing compounds using binary mixtures of adsorbents.
J.Chromatog, 24, 465 (1966)
- 21) Roche, J., Michel, R., Tubiana, M.
Caractères de la thyroglobuline anormale de certains goitres congénitaux avec troubles de l'hormonogénèse.
Rev.franc.Et.clin.biol., 4, 1051 (1959)
- 22) Roche, J., Michel, R., Volpert, E.
Sur la formation d'acides aminés iodés dans la caséine en presence de xantine-oxidase et d'iodures minéraux.
C.R.Soc.Biol., 148, 21 (1954)
- 23) Row, V.V., Volpé, R., Ezrin, C.
¹²⁷I-Iodotyrosine- like compounds in normal human serum,
Clin.Chem.Acta, 13, 666 (1966)
- 24) Scazziga, B-R., Lemarchand-Béraud, T.
Die Pathophysiologie der Schilddrüse.
Documenta Geigy, Acta clinica, 5 (1966)
- 25) Schneider, G., Schneider, C.
Dünnschichtchromatographie von Jodaminosäuren.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem., 332, 316 (1963)
- 26) Stahl, E.
Geräte zur Dünnschichtchromatographie und ihre Handhabung.
In: Dünnschicht-Chromatographie, Hrsgb.: E. Stahl,
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)

- 27) Stanbury, J.B., Kassenaar, A.A.H., Meijer, J.W.A.,
Terpstra, J.
The metabolism of iodotyrosines, I. The fate of
mono- and di-iodotyrosine in normal subjects and
in patients with various diseases.
J.Clin.Endocr., 16, 735 (1956)

- 28) Stanbury, J.B., Meijer, J.W.A., Kassenaar, A.A.H.
The metabolism of iodotyrosines, II. The metabolism
of mono- and di-iodotyrosine in certain patients
with familial goiter.
J.Clin.Endocr., 16, 848 (1956)

- 29) Stanbury, J.B., Morris, M.L.,
The metabolism of 3,3'- di-iodothyronine in man.
J.Clin.Endocr., 17, 1324 (1957)

- 30) Stanbury, J.B., Querido, A.
Genetic and environmental factors in cretinism:
a classification.
J.Clin.Endocr., 16, 1522 (1956)

- 31) Taurog, A., Chaikoff, I.L., Tong, W.
The nature of plasma iodine as revealed by filter
paper partition chromatography.
J. Biol.Chem., 184, 99 (1950)

- 32) Weinert, H., Masui, H., Radichevich, I., Werner, S.C.
Material indistinguishable from iodotyrosines in
normal human serum and human serum albumin.
J.Clin.Invest., 46, 1264 (1967)

- 33) Wellby, M.L.
Methods for the separation and identification of the
iodine-containing amino acids in human plasma.
Austral.J.exp.Biol.med.Sci., 40, 404 (1962)

- 34) Wellby, M.L., Hetzel, B.S.
Demonstration of iodotyrosines in human plasma
in response to thyroid stimulation
Nature (London), 193, 752 (1962)
- 35) Werner, S.C., Block, R.J.
Discrepancy between the distributions of iodine
in human serum when stimulated by iodine-131 and
iodine-127.
Nature (London), 183, 406 (1959)
- 36) Werner, S.C., Radichewich, I.
Presence of iodine-127 iodotyrosines in extracts
of normal human serum.
Nature (London), 197, 887 (1963)
- 37) Wynn, J.
The major human pathway of thyroxine catabolism.
Clin.Res., 11, 232 (1963)
- 38) Yamazaki, E., Noguchi, A., Slingerland, D.W.
Effect of thyroidectomy on plasma butanol-
extractable and protein-bound radioiodine and
on the turnover of radiothyroxine.
J.Clin.Endocr., 21, 336 (1961)
- 39) Zappi, E.
Application of the FFCA-reaction for the detection
of thyroid hormones and iodinated derivatives to
thin-layer chromatography.
J.Chromatog., 31, 241 (1967)

40) Zappi, E.

Characteristics of the reactivity of thyronine, tyrosine and some iodinated derivatives of these substances in the presence of the ferric-ferricyanide-arsenious acid reagent.

z.veröff.

41) Zappi, E., Bubnitz, G.

Combined chemical and isotopic detection of iodoamino acids in thin layer chromatography.

J.Chromatog., 35, 441 (1968)

42) Zappi, E., Hoppe, G.

Serumextraktion und dünnschichtchromatographische Trennung zirkulierender Jodaminosäuren.

Z.klin.Chem.u.klin.Biochem., 5, 209 (1967)

43) Zappi, E., Hoppe, G.

Verhalten organischer und anorganischer ^{131}J -Verbindungen im Laufe einer Serumextraktion von Schilddrüsenhormonen.

Nucl.-Med. VI, 4, 420 (1967)

44) Zappi, E., Hoppe, G.

Qualitative Veränderungen verschiedener jodierter phenolischer Aminosäuren im Laufe einer alkoholischen Extraktion aus wäßrigen Lösungen.

Z.klin.Chem.u.klin.Biochem., 2, 105 (1967)

45) Zappi, E., Hoppe, G., Schmidt, M., Prange, F.

Spektrum der zirkulierenden Schilddrüsenhormone und ihrer Jodderivate im menschlichen Blut.

Z.klin.Chem.u.klin.Biochem., 4, 286 (1968)

Für die Überlassung des Themas und die ständige
Förderung dieser Arbeit bin ich Herrn Professor
Dr. med. K.H. Pfeffer zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. E. Zappi danke ich für die wertvollen
Ratschläge und Anregungen zur Durchführung der
Dünnschichtchromatographie.

Lebenslauf

Am 4. August 1941 wurde ich, Michael, Martin Schmidt, als Sohn des Studienassessors Detlev Schmidt und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Heppes, in Berlin-Wilmersdorf geboren.

Im Jahre 1947 wurde ich in die Volksschule Ochsenfurt/Main eingeschult, die ich 4 Jahre besuchte. Von 1951 bis 1955 war ich Schüler der Oberrealschule Marktbreit/Main.

1955 übersiedelten meine Eltern nach Berlin. Hier besuchte ich die 3. Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges in Berlin-Schöneberg und legte an dieser Schule, im März 1960, die Reifeprüfung ab.

Nach einem halbjährigen Praktikum bei der Firma Siemens & Halske begann ich am 30. September 1960 an der Technischen Universität Berlin Elektrotechnik zu studieren.

Da ich bemerkte, daß ich mit Hilfe dieses Studiums meine Vorstellung eines künftigen Berufes nicht verwirklichen konnte, ließ ich mich im Herbst 1961 in die Medizinische Fakultät der Freien Universität Berlin einschreiben.

Im Dezember 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

Seit Januar 1968 bin ich als Medizinalassistent in Berlin beschäftigt, z.Zt. arbeite ich in der I. Inneren Abteilung des Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses in Berlin-Schöneberg.

